

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 04-023979
(43) Date of publication of application : 28. 01. 1992

(51) Int. Cl. C12N 1/20
C12P 19/42
//(C12N 1/20
C12R 1:01)
(C12P 19/42
C12R 1:01)

(21) Application number : 02-126920 (71) Applicant : KOBE STEEL LTD
(22) Date of filing : 18. 05. 1990 (72) Inventor : KITAURA NOBUYUKI
NISHIMURA KUNIHIRO
MIMURA MORIO
TAKAHARA YOSHIMASA

(54) METHANE-PRODUCING BACTERIUM AND PRODUCTION OF VITAMIN B12 USING SAME BACTERIUM

(57) Abstract:

PURPOSE: To industrially produce vitamin B12 and enable stable supply of vitamin B12 by culturing methane-producing bacterial H117-1-2 and KN-15 having high vitamin B12 producing ability and high proliferation rate and collecting vitamin B12 from the cultured mixture.

CONSTITUTION: H117-1-2 (FERM P-11356) and KN-15 (FERM P-11420) being gas-assimilating methane-producing bacterium belonging to the genus *Methanobacterium* and capable of producing methane from carbon dioxide and hydrogen and having high vitamin B12 producing ability and high proliferation rate are sufficiently cultured using No. 1-modified Balch culture medium. Then the bacterial cell is directly extracted with a solvent or crushed by a well-known method such as ultrasonic wave or enzyme treatment and then extracted and the cultured liquid is directly extracted with a solvent. Then the extracted liquid is further properly treated by well-known separation and purification means such as precipitation and recrystallization to collect the vitamin B12. Thereby a large number of vitamin B12 can industrially be obtained from the cultured mixture.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-23979

⑬ Int. Cl. *

C 12 N 1/20
 C 12 P 19/42
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:01)
 (C 12 P 19/42
 C 12 R 1:01)

識別記号

府内整理番号

A 7236-4B
8214-4B

⑬ 公開 平成4年(1992)1月28日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全8頁)

⑭ 発明の名称 メタン生成細菌およびそれを利用するビタミンB₁₂の製造法

⑮ 特願 平2-128920

⑯ 出願 平2(1990)5月18日

⑰ 発明者 北浦伸幸 水城県つくば市並木3-23-7 ルミナス並木402
 ⑰ 発明者 西村訓弘 水城県つくば市春日2-18-5 コベルコハイツ201
 ⑰ 発明者 三村精男 静岡県富士市宮下435-7
 ⑰ 発明者 高原義昌 千葉県習志野市谷津5-29-8
 ⑰ 出願人 株式会社神戸製鋼所 兵庫県神戸市中央区鶴浜町1丁目3番18号
 ⑰ 代理人 弁理士 戸田親男

明細書

1. 発明の名称

メタン生成細菌およびそれを利用するビタミンB₁₂の製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) メタン生成細菌 KN-15.
- (2) メタン生成細菌 H117-1-2.
- (3) 細菌 H117-1-2及び/又はKN-15を有効菌とすることを特徴とするビタミンB₁₂生産菌.
- (4) 細菌 H117-1-2及び/又はKN-15を培養することを特徴とするビタミンB₁₂の製造法.
- (5) 細菌 H117-1-2及び/又はKN-15を培養し、培養物からビタミンB₁₂を採取することを特徴とするビタミンB₁₂の製造法.

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、温泉噴出口付近の土壌から新たに分離したメサノバクテリウム属菌及びそれを用いるビタミンB₁₂の新規工業的製造方法に関するものである。

(従来の技術および本発明が解決しようとする問題点)

一般に、産業的に微生物を利用する場合、使用する微生物の性質、特に、増殖能および有用物質の生成能が重要な要素となる。発明者らは、このうちの、有用物質の生成能、すなわち、微生物を産業的に利用する場合、増殖能がある程度高く、かつ生成能が高ければ高いほど、原料費を削減でき、また培養時間も短縮でき、さらに必要な培養装置も小さくすることができることに着目した。また、微生物を培養する場合、NaClなどの塩濃度は、発酵の腐食防止あるいは副原料費の削減からも低いほど望ましく、NaCl要求性の微生物は産業上、有利とは言い難い。

一方、産業副産物として、また副産物として多量のガスが排出されており、一部がエネルギー源として回収されている程度で、その利用度は必ずしも高いとは言えない。ガスの中には、微生物の炭素源になりうる二酸化炭素やエネルギー源になる水素あるいは一酸化炭素などが含まれている。従って、その有効利用は、地球環境への負担を減

らす意味からも大きな課題である。発明者らは、微生物を利用したガスの有効利用を図るために、メタン生成細菌に着目した。この微生物群には、二酸化炭素、水素、一酸化炭素からメタンを生成することができるものが存在するので、有用な微生物の取得のために、二酸化炭素と水素を基質に増殖するガス変化性メタン生成細菌の探索を行った。

メタン生成細菌は、有用物質の1つであるビタミンB₁₂を、他の微生物にくらべて、その含有量が高いことが知られている(*Current Microbiol.*, 3, 243(1980))。

従来、二酸化炭素と水素を変化し、メタンを生成する、いわゆるガス変化性メタン生成細菌としては、メサノバクテリウム(*Methanobacterium*)属、メサノブレビバクター(*Methanobrevibacter*)属、メサノサーマス(*Methanochlorus*)属、メサノコッカス(*Methanococcus*)属、メサノミクロビウム(*Methanocicrobium*)属、メサノスピリラム(*Methanospirillum*)属、メサノゲニウム(*Methanogenium*)属、メサノカルプスカラム

(*Methanocorpusculum*)属、メサノサルシナ(*Methanoscincina*)属、メサノプラナス(*Methanoplaena*)属らに属するものが知られている(*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38, 212-218(1988))。

しかしながら、これらは、増殖速度が高いものでも、最適NaCl濃度が高い場合あるいは、低濃度のNaClでは生育できない場合、逆に最適NaCl濃度が低いが増殖速度が低いなどの欠点を有している(*酵酛工学*, 64, 2, 115-137(1988))。さらに、ビタミンB₁₂生成量が高くても、増殖速度が極めて低いものや、増殖速度は高いが、ビタミンB₁₂生成量が高くないなどの問題があった(*Current Microbiol.*, 3, 243(1980))。

ビタミンB₁₂は、悪性貧血などの治療薬、および動物の成長促進物質として飼料添加剤等に利用される重要な化合物である。しかしながら現在、その複雑な構造のために、グルコースを原料に発酵法により生産されている。使用される微生物は、プロビオン菌群すなわちプロビオニバクテリウム

属や、バチルス属のものが使われている。

メタン生成細菌を用いるビタミンB₁₂の製法に関するものとして、メタノールを原料に、メサノサルシナ・バーケリ(*Methanococcus barkeri*)によるものが報告されている(特開昭63-91004、特開昭63-91015、BIO INDUSTRY, 5, 3, 190(1988)、ビタミン, 62, 52, 657(1988))が、この微生物は、ガスを利用することができるものの、その増殖速度は極めて低く、産業的には向かない。ガス変化性メタン生成細菌によるビタミンB₁₂の生産もメサノバクテリウム・サーモオートトロフィカム(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)△号(DSM 1053)で報告されている(昭和63年度日本发酵工学会大会講演要旨集, p137 (1988))が、そのビタミンB₁₂生成能が低いために、その生産性は低い。

このように従来技術においては、工業的にビタミンB₁₂を製造する方法は確立されていなかったのである。

(問題点を解決するための手段)

本発明は上記した技術の現状に鑑み、ますますその需要が増大しているビタミンB₁₂を安定供給する目的でなされたものである。

上記目的を達成してビタミンB₁₂を工業的に製造する方法について有機合成、天然物からの抽出等各方面から検討したけれども成功するに至らず、微生物を使用する発酵法に再度着目することとした。

そこでビタミンB₁₂生成菌としても知られているメタン生成菌について、先ずその工場的見地から、NaCl要求性が低く、増殖速度が高いガス変化性メタン生成菌の探索を広く行った結果、これまでにないすぐれた性質を有するメタン生成細菌を温泉噴出口付近の土壤から新たに分離することに成功した。

そしてこれらのメタン生成細菌について更に詳しく検討したところ、全く予期せざることに、従来にない高いビタミンB₁₂生成能を有するという新規性を得、しかもこれらを培養することによって培養物からビタミンB₁₂を工業的に採取しうる

ことを併せ確認し、本発明の完成に至ったのである。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) ガス変化性メタン生成細菌の分離

ガス変化性メタン生成細菌の分離には、Belch らの No. 1 培地 (Microbiol. Rev., 43, 260-286 (1979)) を改変した培地を用いた (表 1)。国内各地より採取した試料を分離用培地に嫌気的に接種し、振とう培養を行い、増殖が認められたものを、次の新しい培地に無菌的にかつ嫌気的に接種することにより、目的とするガス変化性メタン生成菌の集積を図り、次にヒールチューブ法 (使用培地は表 1 に寒天を加えたもの、寒天濃度 2.0%) によりコロニーを形成させ、最終的に単一コロニーにより目的菌株を単離した。培養温度は、先述のガス変化性メタン生成菌の中では、NaCl 要求性が低く増殖速度が高い菌株の最適温度 (50~70°C) をもとに、60°C に設定した。また、メタン生成細菌のような偏性嫌気性菌の扱い方は常法に従った。

表 1 Belch らの No. 1 改変培地

| | | |
|---|--------|------|
| K ₂ HPO ₄ | 0.3 | g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0.3 | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.3 | |
| NaCl | 1.0 | |
| Na ₂ SO ₄ ·7H ₂ O | 0.16 | |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.009 | |
| MnSO ₄ ·2H ₂ O | 0.005 | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.003 | |
| CoCl ₂ | 0.001 | |
| ZnSO ₄ | 0.001 | |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.0001 | |
| AlN(SO ₄) ₂ | 0.0001 | |
| B ₂ O ₃ | 0.0001 | |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.0001 | |
| NaCl ₄ ·6H ₂ O | 0.001 | |
| Na ₂ SeO ₃ | 0.0017 | |
| Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O | 0.001 | |
| Nitribacteriaceic acid | 0.015 | |
| NaHCO ₃ | 5.0 | |
| Yeast extract (Difco) | 0.05 | |
| Trypticase (BBL) | 0.05 | |
| L-cysteine·HCl·H ₂ O | 0.5 | |
| Na ₂ S·9H ₂ O | 0.5 | |
| Trace vitamin 1) | 10.0 | ml/l |
| pH 7.2 気相 H ₂ /CO ₂ = 4/1、圧力 (1.8kg/cm ²) | | |

1) 繁殖ビタミン類の組成

| | | |
|---------------------|-----|------|
| ビオチン | 2 | mg/l |
| 葉酸 | 2 | |
| ビリドキシン·HCl | 10 | |
| チアミン·HCl | 5 | |
| リボフラビン | 5 | |
| ニコチニ酸 | 5 | |
| パントテン酸カルシウム | 5 | |
| ビタミンB ₁₂ | 0.1 | |
| アミノ安息香酸 | 5 | |
| リボ醇 | 5 | |

(2) 比増殖速度の測定方法およびビタミンB₁₂の測定方法
比増殖速度の測定に用いた培地には、表 1 に記載した培地成分中の酵母エキス (yeast extract (Difco)) およびトリプチケース (Trypticase (BBL)) を各々 2g/l にしたものを用いた。培地 20ml を入れた 125ml 容のバイアルビンに、予め培養していたメタン生成細菌の培養液 (660nm の吸光度 (A₆₆₀) が 0.5~0.8 のもの) を嫌気的かつ嫌気的に接種し、所定温度で振とう培養 (160rpm) した。液体濃度増加の追跡のために毎時的に培養液を抜取って A₆₆₀ を測定し、グラフにプロットすることにより比増殖速度を求めた。なお、ガスを捕うために、培

養液を抜き取ると同時に基質ガス (CO₂/H₂ = 1/4) を 1.8kg/cm² まで加圧した。

培養液中のビタミン B₁₂ 濃度は、培養終了後の培養液 0.05ml に 0.1% KCN 液 1ml を加え、0.01N 酸酸にて pH を 6 に調整後、115°C、15 分間のオートクレーブにより抽出し、常法による大腸菌 *E. coli* 215 株を用いるバイオアッセイ法で測定した (ビタミン, 57, 11, 609~616 (1983))。

(3) II117-1-2 および KN-15 の分離

上記の方法により、発明者らは、全国各地から採取した試料 410 点から、細菌を行い、温泉噴出口付近の土壤試料より、ビタミン B₁₂ 生産能が高く、増殖速度が高い II117-1-2 および KN-15 を得ることに成功した。これらの菌株の比増殖速度測定時の培養経過を、第 1 図及び第 2 図にそれぞれ示した。

(4) II117-1-2 および KN-15 の生理学的性質

これらの菌は、二酸化炭素と水素からメタンを生成するガス変化性メタン生成細菌であり、また、グラム染色では陽性を示し、形態が桿菌であるこ

とから、メタン生成細菌の検索表(醸酢工学、64, 2, 115-137(1986))及び文献(Int. J. Syst. Bacteriol., 38, 212-219(1988))をもとに検索した結果、メサノバクテリウム(*Methanobacterium*)属または、メケノサーマス(*Methenothermus*)属に属するものと考えられた。

次に、BL17-1-2及びKN-15は、増殖最適温度がそれぞれ69℃及び65℃にあることから、最終的には、これらの菌株は、メリノサーマス属ではなく、メサノバクテリウム属に属する微生物であると考えられた。表2に示すように、メサノバクテリウム属に属し、増殖最適温度が50~70℃にある2種との比較を行った。

表2 BL17-1-2, KN-15とメサノバクテリウム属との比較

| | BL17-1-2 | KN-15 | <i>M. thermoeutrophicum</i> | | DSM 1053 | DSM 2970 |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|-----------------------------|------------------|----------|----------|
| | | | <i>M. thermoeutrophicum</i> | <i>M. wolfei</i> | | |
| グラム染色 | + | + | + | + | + | + |
| 形態 | rod | rod | rod | rod | | |
| 大きさ | 0.3~0.6 ×1~3 | 0.3~0.6 ×1~30 | 0.3~0.6 ×3~120 | 0.4× 2.4~2.7 | | |
| 生育温度(℃) | 50~70 | 50~70 | | | | |
| 最適温度(℃) | 60 40<+<75 | 65 40<+<75 | 65~70 | 55~65 | | |
| 生育pH | 6.0~8.5 | 6.0~8.8 | | | | |
| 最適pH | 7.4~7.5 | 7.4~7.8 | 7.2~7.6 | 7.0~7.7 | | |
| メタン基質 | | | | | | |
| H_2/CO_2 | + | + | + | + | | |
| HCOOH | - | - | - | - | | |
| CH_3COOH | - | - | - | - | | |
| CH_3OH | - | - | - | - | | |
| CH_3NH_2 | - | - | - | - | | |
| $\mu_{\text{max}}(\text{h}^{-1})$ | 0.45(60℃) | 0.62(65℃) | 0.43* | 0.173~0.198 | | |
| GC含量(%) | | | 48~52 | 61 | | |
| 運動性 | - | - | - | - | | |
| NaCl(%) | 0~2 | 0~2 | ND | <1.7 | | |

*: 増殖速度測定時に用いた培地では、0.4h⁻¹であった。

表2の比較の結果、BL17-1-2は、メサノバクテリウム(*Methanobacterium*)属のサーモオートトロフィカム(*thermoautotrophicum*)、およびウォルフェイ(*wolfei*)に基質変化性や最適温度、最適pHなどを類似しているが、比増殖速度が、ウォルフェイ(*wolfei*)に比較してかなり高いことから、メサノバクテリウム・サーモオートトロフィカム(*Methanobacterium thermoeutrophicum*)に近いものと考えられる。しかし、細胞形態や増殖最適温度が60℃であることなどからメサノバクテリウム・サーモオートトロフィカムDSM 1053とは異なるものと考えられる。

また、KN-15は、増殖速度が0.62h⁻¹を示し、メサノバクテリウム・ウォルフェイの増殖速度より、はるかに高いという、明らかに異なる性質を有している。また、メサノバクテリウム・サーモオートトロフィカムとの比較では、増殖速度や細胞形態が明らかに異なる。

増殖速度は、細胞の統合代謝の表現型として、特にメタン生成細菌では重要なこと

から、BL17-1-2及びKN-15を、メサノバクテリウム属に属し、メサノバクテリウム・サーモオートトロフィカムに近い新種であると同定した。これらの菌の生理学的性質を表3及び表4に示した。

これらの菌は、工業技術院微生物工業技術研究所に「微生物受託番号、微生物菌寄第11356号(FERM P-11356)及び微生物菌寄第11420号(FERM P-11420)」のもとにそれぞれ微生物保管を委託した。

BL17-1-2は、NaCl濃度が高い(2%以上)の培地では増殖が認められず、高い増殖速度は、低いNaCl濃度(0.1%以下)で得られている。

KN-15の高い増殖速度は、表1に示すような低NaCl濃度培地で得られ、高NaCl濃度培地では、得られず、KN-15の増殖は阻害される。

表3 HIIT-1-2の生理学的性質

1. 形態的性質：培地組成は肉汁および肉汁寒天を基準とするが、これに生育しないものについては、適当な培地を用いてもよい。となっているので、別途示したBalch No.1 改変培地を用いた。

①形：長桿菌(対数増殖期)、鞭毛なし
大きさ：0.3~0.5×1~3

②細胞の多形性：なし

③運動性：なし

④孢子形成：なし

⑤グラム染色性：陽性

2. 培養的性質：以下の培地に生育しないものについては他の生育に適当な培地における生育状態を記載する。となっているので、別途に示したBalch No.1 改変培地を基本培地とし、コロニー細胞にはロールチューブ法によってコロニーを形成させた。

①肉汁培地：生育しない

②改変Balch No.1 寒天培地(培養温度60°C、培養時間5日間)：生育良好、周縁がスムース、緑色がかった薄乳色、

するが、亜酸、酢酸、メタノール、メチルアミンは利用しない。

4. 分離源：温泉噴出口付近の土壤

直径2~4mm、色素生成なし

3. 生理的性質：

- ①無機窒素源の利用：アンモニウム塩を利用する。
- ②色素の生成：培養後液体培地はメタン生成細菌特有の黄緑色になる。
- ③生育範囲温度：40~70°C、40°C以下75°C以上では生育しない
生育最高温度：60°C
- ④生育範囲pH：6.0~8.5
生育最高pH：7.4~7.5
- ⑤酸素要求：絶対嫌気性
- ⑥ガスの発生：
- (1)L-アラビノース、(2)D-キシロース、(3)D-グルコース、(4)D-マンノース、(5)D-フラクトース、(6)D-ガラクトース、(7)マルトース、(8)ショクロース、(9)ラクトース、(10)トレハロース、(11)D-ソルビット、(12)D-マンニット、(13)イノシット、(14)グリセリン、(15)澱粉から醸化も発酵も行わない。
- ⑦食塩耐性：2%まで生育する。
- ⑧炭素源の利用性：CO₂(H₂存在下)を利用してメタンを生成

表4 KN-15の生理学的性質

1. 形態的性質：培地組成は肉汁および肉汁寒天を基準とするが、これに生育しないものについては、適当な培地を用いてもよい。となっているので、別途示したBalch No.1 改変培地を用いた。

①形：長桿菌(対数増殖期)、鞭毛なし
大きさ：0.3~0.5×1~10

②細胞の多形性：なし

③運動性：なし

④孢子形成：なし

⑤グラム染色性：陽性

2. 培養的性質：以下の培地に生育しないものについては他の生育に適当な培地における生育状態を記載する。となっているので、別途に示したBalch No.1 改変培地を基本培地とし、コロニー細胞にはロールチューブ法によってコロニーを形成させた。

①肉汁培地：生育しない

②改変Balch No.1 寒天培地(培養温度60°C、培養時間5日間)：生育良好、周縁がスムース、緑色がかった薄乳色、

直径2~5mm、色素生成なし

3. 生理的性質：

- ①無機窒素源の利用：アンモニウム塩を利用する。
- ②色素の生成：培養後液体培地はメタン生成細胞特有の黄緑色になる。
- ③生育範囲温度：40~70°C、40°C以下75°C以上では生育しない
生育最適温度：65°C
- ④生育範囲pH：6.0~8.8
生育最適pH：7.4~7.8
- ⑤酸素要求：絶対嫌気性
- ⑥ガスの発生：

 - (1)L-アラビノース、(2)D-キシロース、(3)D-グルコース、(4)D-マンノース、(5)D-フラクトース、(6)D-ガラクトース、(7)マルトース、(8)シュクロース、(9)ラクトース、(10)トレハロース、(11)D-ソルビット、(12)D-マンニット、(13)イノシット、(14)グリセリン、(15)澱粉から醸化も発酵も行わない。
 - ⑦食塩耐性：2%まで生育する。
 - ⑧炭素源の利用性：CO₂(H₂有在下)を利用してメタンを生成

するが、甘酸、酢酸、メタノール、メチルアミンは利用しない。

4. 分離場：温泉噴出口付近の土壤

これらH117-1~2及びノ又はEN-15を上記により充分培養した後、培養物からビタミンB₁₂を採取する。それには各法が適宜使用され、例えば、固体について、これを直接溶媒で抽出するほか、超音波、蘇生等既知の物理ないし化学的方法によって溶解した後抽出し、また、培養液についてもこれをそのまま溶媒で抽出する。ただ、溶媒抽出の前及びノ又は後に減圧濃縮、限外濾過等の方法で濃縮して濃縮液としてもよい。抽出液は、更にクロマトグラフィー、溶媒による沈澱、再結晶等既知の分離、精製手段によって、適宜処理される。ビタミンB₁₂は、上記のように精製して用いるほか、飼料添加物等として用いる場合には、固体、培養液、又はこれらの混合物、あるいは上記した濃縮液等未精製のままでも使用することができる。

次に、本発明に係る菌が既知のガス変化性菌よりもビタミンB₁₂生成能が優れていることおよびビタミンB₁₂の製造法について実験例で説明する。

(実施例1)

まず、比較のために、既知のガス変化性メタン

生成細菌による二酸化炭素と水素からのビタミンB₁₂生成を調べた。ドイツの微生物保存機関のDSMに保存されているガス変化性菌の中から代表的な菌株を選び、各1の培地に生育するものについては、菌1の培地とDSM指定の保存培地で、表1の培地で生育しないものは、DSM指定の保存培地にて、所定温度で7日間または3日間培養培養し、菌体濃度(400g)およびビタミンB₁₂濃度を先述の方法にて測定した。その結果を表4-1および表4-2に示す。ビタミンB₁₂生成量および菌体の増殖量から、明らかにDSM 1053のメサノバクテリウム・サモガートトロフィカム(*Nethenobacterium thersosutrophicum*)が最もビタミン生成能が高い菌株であることがわかる。

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
B. B. H. (国際寄託機関、ブダペスト通報No.22)。

| DSM No. | 菌種名 | 使用方法 | 培養温度(°C) | 培養日数(day) | 菌体濃度(ug/l) | ビタミンB ₁₂ 濃度(ug/l) | 生産性 |
|---------|---|---------|----------|-----------|------------|------------------------------|--------|
| 2085 | <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> | DSM 141 | 65 | 7 | 0.636 | 0.046 | 0.026 |
| 2661 | <i>Methanococcus jannaschii</i> | DSM 222 | 60 | 3 | 0.349 | <0.005 | <0.014 |
| 1053 | <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | DSM 119 | 65 | 7 | 0.518 | 0.078 | 0.151 |
| 863 | <i>Methanobacterium boyantii</i> | DSM 119 | 37 | 7 | 0.173 | 0.015 | 0.047 |
| 1545 | <i>Methanobacterium formicicum</i> | DSM 119 | 37 | 7 | 0.261 | 0.020 | 0.116 |
| 1583 | <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> | DSM 119 | 37 | 7 | 0.175 | 0.018 | 0.103 |
| 864 | <i>Methanospirillum hungatei</i> | DSM 119 | 37 | 7 | 0.226 | 0.035 | 0.156 |

表4-1 DSM株のDSM培地におけるビタミンB₁₂生成

| DSM No. | 菌種名 | 使用方法 | 培養温度(°C) | 培養日数(day) | 菌体濃度(ug/l) | ビタミンB ₁₂ 濃度(ug/l) | 生産性 |
|---------|---|------|----------|-----------|------------|------------------------------|-------|
| 1053 | <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | 液1 | 65 | 7 | 0.402 | 0.068 | 0.164 |
| 863 | <i>Methanobacterium boyantii</i> | 液1 | 37 | 7 | 0.051 | 0.005 | 0.098 |
| 1545 | <i>Methanobacterium formicicum</i> | 液1 | 37 | 7 | 0.163 | 0.016 | 0.086 |
| 864 | <i>Methanospirillum hungatei</i> | 液1 | 37 | 7 | 0.099 | 0.008 | 0.091 |

表4-2 DSM株の表1の培地におけるビタミンB₁₂生成

次に、H117-1-2株(FERM P-11356)とDSM 1053株とを比較した。

使用培地は、表1の培地成分中の酵母エキス(*Yeast extract(Difco)*)およびトリプチケース(*Trypticase(BBL)*)濃度を各々2g/lにしたものを使い、20mlの培地を入れた 125ml密閉バイアルビンに、予め培養していたガス変化性メタン生成細菌 H117-1-2の懸濁液(660nmの吸光度 A_{660} が0.5~0.8)を6.5ml接種し、60°Cで振とう培養液(150rpm)とした。菌体濃度増加を追跡するために、経時的に培養液を採取し、 A_{660} を測定するとともに、基質ガス($CO_2/H_2 = 1/4$)をバイアルビン内部のガス圧力が1.8kg/cm²になるように供給加圧した。一定時間培養後、培養液中のビタミンB₁₂をシアノ型に変換した後、常法により、大腸菌 *E. coli* 215株を用いるバイオアッセイ法で測定した。比較のために、メサノバクテリウム・サーモオートトロフィカム(*Methanobacterium thermoaotrophicum*)のビタミンB₁₂生成の検討を同一実験系で行った。吸光度 A_{660} の経時変化を

第1回に、またビタミンB₁₂濃度については、その結果を表5に示した。

表5 ガス変化性メタン生成菌によるビタミンB₁₂の生成

| H117-1-2 & <i>M. thermoautotrophicum</i> | | |
|--|----------|-------|
| | DSM 1053 | |
| 接種時の A_{660} | 0.027 | 0.030 |
| 7時間後の A_{660} | 0.680 | 0.571 |
| B ₁₂ 濃度(ug/l) | 0.139 | 0.099 |
| B ₁₂ 生成能(ug/l/ A_{660}) | 0.200 | 0.173 |
| 比増殖速度(h ⁻¹) | 0.42 | 0.38 |

表5の結果から明らかのように、H117-1-2株の方が、ビタミンB₁₂濃度および菌体当たりのビタミンB₁₂生成量(ビタミンB₁₂濃度/菌体濃度(A_{660})))、さらに増殖速度も高いことが示された。すなわち、H117-1-2株を用いることにより、低NaCl濃度の培地で、短時間に、より高濃度に、かつ高収率でビタミンB₁₂を生産できることが判明した。

(実施例2)

KN-15株(FERM P-11420)を用い、培養温度を

65°Cとしたほかは実験例1と同様にしてビタミンB₁₂を生産せしめた。吸光度 A_{660} の経時変化を第2回に、またビタミンB₁₂濃度については、その結果を表6に示した。

表6 ガス変化性メタン生成菌によるビタミンB₁₂の生成

| | KN-15 & <i>M. thermoautotrophicum</i> | DSM 1053 |
|--------------------------|---------------------------------------|----------|
| 接種時の A_{660} | 0.018 | 0.030 |
| 6時間後の A_{660} | 0.591 | 0.263 |
| B ₁₂ 濃度(ug/l) | 0.100 | 0.046 |
| 比増殖速度(h ⁻¹) | 0.618 | 0.389 |

表6から明らかなように、KN-15株の方が、ビタミンB₁₂濃度および増殖速度も高いことが示された。つまり、KN-15株を用いれば、従来のガス変化性菌よりも、二酸化炭素と水素からビタミンB₁₂を効率的に製造できることが明らかになった。

(発明の効果)

本発明によって、低食塩培地において非常に高

第1図

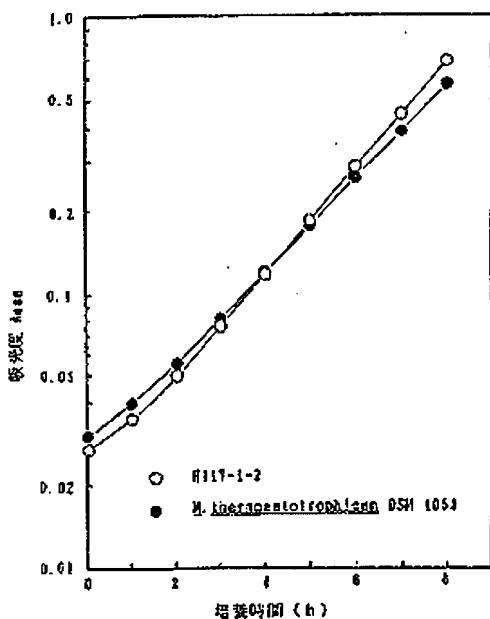
い速度で増殖ししかもビタミンB₁₂生成物にすぐれたメタン生成細菌を新たに分離することができた。そしてこれらの細菌を培養することによって培養物からビタミンB₁₂を工業的に得ることに成功した。

すなわち、培養した後、培養液は常法により抽出処理を行い、菌体についてはこれを直接抽出したりあるいは超音波等既知の手段によって菌体を破壊した後これを抽出し、次いで常法にしたがって分離精製することにより多量のビタミンB₁₂を得ることができる。

つまり、本発明によってはじめて、ビタミンB₁₂の工業的製法の開発に成功したのである。

4. 図面の簡単な説明

第1図及び第2図は、本発明に係る微生物について、その吸光度の経時変化を図示したグラフである。



代理人 弁理士 戸 田 純 男

第2図

